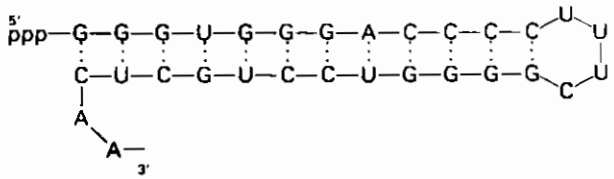
บทที่ 12
การสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลิเคชัน

วัตถุประสงค์ เมื่อนักศึกษาเรียนจบบทนี้แล้ว ควรจะมีความสามารถในการ

1. บอกความแตกต่างระหว่างวิธีการสังเคราะห์ DNA ที่อาจเป็นไปได้ทั้ง 3 แบบ
2. อธิบายการสังเคราะห์ DNA หรือกระบวนการเรพลิเคชันแบบกึ่งอนุรักษ์
3. จำแนกประเภท คุณสมบัติและการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerases
4. อธิบายการทำงานของเอ็นไซม์ DNA ligase
5. เรียบเรียงขั้นตอนกระบวนการเรพลิเคชันตามลำดับ พร้อมเอ็นไซม์และแฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่จำเป็นตลอดจนการยับยั้งกระบวนการ
6. เขียนการเรียงตัวที่ผิดปรกติของเบสบนสาย DNA เพื่อแสดงการผ่าเหล่าแบบต่าง ๆ
7. เขียนกลไกการซ่อมแซม DNA ที่ผ่าเหล่า พร้อมตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่าระบบซ่อมแซม DNA อาจป้องกันมิให้เกิดการผ่าเหล่าได้

บทนำ

โมเลกุล RNA เป็นสายของนิวคลีโอไทด์ที่ต่อเนื่องกัน อาจมีความยาวตั้งแต่ 75 จนถึงหลาย ๆ พันนิวคลีโอไทด์ เชื่อมกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ มีลักษณะเป็นสายเดี่ยวจึงไม่จำเป็นต้องมีเบสที่เข้าคู่กัน ยกเว้นในไวรัสบางชนิดเท่านั้นที่จะมี RNA สายคู่ บางครั้งโมเลกุล RNA สายเดี่ยวอาจจะโค้งงอเป็น hair-pin loop จนมีลักษณะเป็นเกลียวคู่คล้าย DNA มีการจับคู่ของเบสระหว่าง A กับ U และ G กับ C G อาจจับกับ U ได้แต่พันธะไฮโดรเจนจะไม่แข็งแรงเท่ากับคู่เบส GC การจับคู่ของเบสใน hair-pin ไม่ค่อยสมบูรณ์นักเพราะเบสที่สร้างพันธะไฮโดรเจนเข้าด้วยกันอาจจะไม่ใช่คู่เบสที่เหมาะสมกันดังในกรณี GU



RNA ในเซลล์แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ messenger RNA (mRNA), ribosomal RNA (rRNA) และ transfer RNA (tRNA) แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 13-1) สำหรับแบคทีเรีย RNA ส่วนใหญ่อยู่ในไซโตปลาสซึม ส่วนเซลล์ของพวกยูคาริโอทนั้น RNA จะกระจายอยู่ทั่วไป เช่น ในเซลล์ตับจะพบ RNA ทั้งในนิวเคลียสในไซโตซอล ในไมโตคอนเดรีย และในไรโบโซม

ตารางที่ 13-1 คุณสมบัติของ RNA ทั้งสามชนิดของ E.Coli

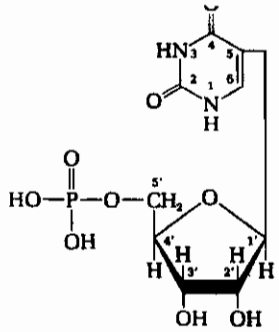
ชนิด	ปริมาณสัมพัทธ์ (%)	สัมประสิทธิ์การเซดิเมนต์ (S)	น.น. (กิโลดาลตัน)	จำนวนนิวคลีโอไทด์
Ribosomal RNA (rRNA)	80	23	1.2×10^3	3,700
		16	0.55×10^3	1,700
		5	3.6×10^1	120
Transfer RNA (tRNA)	15	4	2.5×10^1	75
Messenger RNA (mRNA)	5		Heterogeneous	

Messenger RNA (mRNA) เป็น RNA ที่มีปริมาณน้อยที่สุดคือประมาณ 5% ของ RNA ทั้งหมด สังเคราะห์ขึ้นภายในนิวเคลียส mRNA บางส่วนอาจถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในไมโตคอนเดรีย การสังเคราะห์จะใช้ DNA สายใดสายหนึ่งเป็นแม่พิมพ์ ดังนั้นการเรียงตัวของเบสบน mRNA จะต้องเข้าคู่กันกับเบสบนสาย DNA ที่เป็นแม่พิมพ์ mRNA ประกอบด้วยเบสเพียง 4 ชนิดเท่านั้น mRNA ที่สังเคราะห์ในนิวเคลียสจะเคลื่อนตัวออกไปยังไรโบโซมซึ่งอยู่ในไซโตปลาสซึมเพื่อทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป mRNA ของยูคาริโอทจะมี poly A คือเบสอะดินีนล้วนประมาณ 200 หน่วยทางปลาย 3 คาดว่า poly A จะมีส่วนช่วยในการส่งผ่าน mRNA ออกจากนิวเคลียสไปยังไซโตปลาสซึม

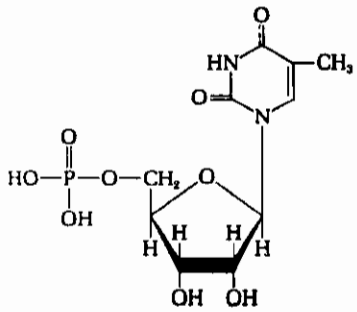
Ribosomal RNA (rRNA) เป็นองค์ประกอบหลักของไรโบโซม มีบทบาทและหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนหรือไม่นั้นยังไม่เป็นที่กระจ่างนัก ปริมาณมากถึง 80% ของ RNA ทั้งหมด rRNA ใน E.Coli แบ่งเป็น 3 ชนิดตามสัมประสิทธิ์การเซดิเมนต์ (sedimentation coefficient) คือ 23s, 16s และ 5sRNA ในเซลล์ของพวกยูคาริโอท rRNA แบ่งเป็น 4 ชนิด คือ 5s, 7s, 18s และ 28sRNA

Transfer RNA (tRNA) เป็น RNA ที่โมเลกุลเล็กสุด มีปริมาณ 15% ของ RNA ทั้งหมด ทำหน้าที่เป็นตัวพาที่จำเพาะพากรดอะมิโนไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนที่ไรโบโซม กรดอะมิโนแต่ละตัวจะมี tRNA ที่จำเพาะอย่างน้อยที่สุดหนึ่งตัว แต่อาจมีมากกว่าหนึ่งก็ได้ ตัวอย่างเช่น ใน E.Coli มี tRNA ที่จะพากรดอะมิโนลูซีนไปที่ไรโบโซมถึง 5 ตัวด้วยกัน แต่ละตัวก็แตกต่างกันออกไป โมเลกุล tRNA มักจะมีนิวคลีโอไทด์ที่หายาก เช่น pseudouridylic acid และ ribothymidylic acid (รูปที่ 13-1) ที่ปลายข้างหนึ่งของ tRNA ทุกตัวจะเป็น guanylic acid (pG) และปลายอีกข้างหนึ่งจะเป็น cytidylic-cytidylic-adenylic acid (C-C-A) เสมอ หมู่ 5 -OH ของ adenylic acid จะเชื่อมอยู่กับหมู่ 3 -OH ของ cytidylic acid ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ส่วนหมู่ 3 -OH ของ adenylic acid ที่ยังเป็นอิสระอยู่เป็นหมู่ที่จะเกิดปฏิกิริยาอะเซทิเลชันกับกรดอะมิโน ได้เป็น aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) เร่งปฏิกิริยาโดยเอ็นไซม์ aminoacyl tRNA synthetase tRNA จะพากรดอะมิโนใดไปที่ไรโบโซมนั้นขึ้นอยู่กับรหัสตติยะหรือโคดอนบนสาย mRNA

สัมประสิทธิ์การเซดิเมนต์ (sedimentation coefficient) มีหน่วยเป็น svedberg unit (s) ตั้งชื่อตามผู้ประดิษฐ์ ultracentrifuge ชาวสวีเดน 1s = 10^{-13} วินาที



Pseudouridylic acid



Ribothymidylic acid

รูปที่ 13-1 : Pseudouridylic acid **เป็นนิวคลีโอไทด์ที่หายากเพราะน้ำตาลไรโบสสร้างพันธะไกลโคซิดิคกับ** เบสยูราซิลตรงตำแหน่ง C_5 **ไม่ใช่ตำแหน่ง** N_1 **เหมือนนิวคลีโอไทด์ทั่วๆ ไป ส่วน** ribothymidylic acid **โครงสร้างมีเบสไธมีนซึ่งปรกติไม่ค่อยจะพบใน** RNA **แต่จะพบใน** DNA

13.1 เอ็นไซม์ RNA polymerase

ใน E.Coli และโปรคาริโอทจะมีเอ็นไซม์ RNA polymerase เพียงชนิดเดียวที่สังเคราะห์ทั้ง mRNA, tRNA และ rRNA แต่ในยูคาริโอทจะมีเอ็นไซม์ RNA polymerase 4 ชนิดดังในตารางที่ 13-2

ตารางที่ 13-2 ชนิดของเอ็นไซม์ RNA polymerase ในยูคาริโอท

ชนิดของเอ็นไซม์	ตำแหน่ง	ความไวต่อสารพิษอัลฟาอะมานิติน	RNA ที่สังเคราะห์
1. RNA polymerase I	นิวคลีโอลัส	ไม่ถูกยับยั้งโดยสารพิษ	rRNA
2. RNA polymerase II	นิวคลีโอปลาสซึม	ถูกยับยั้งโดยสารพิษที่ความเข้มข้นต่ำประมาณ $10^{-8}-10^{-9}$ M	mRNA
3. RNA polymerase III	นิวคลีโอปลาสซึม	ถูกยับยั้งโดยสารพิษที่ความเข้มข้นสูงประมาณ $10^{-5}-10^{-6}$ M	tRNA
4. RNA polymerase IV	ผนังด้านในของไมโตคอนเดรีย	ไม่ถูกยับยั้งโดยสารพิษ	RNA ในไมโตคอนเดรีย

เอ็นไซม์ RNA polymerase ของ E.Coli มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 490,000 ประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) 4 ชนิดแต่เป็นจำนวน 5 หน่วยย่อย คือ $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ทั้งหมดนี้จัดเป็นโฮโลเอ็นไซม์ ซิกมาแฟคเตอร์ (σ) แตกตัวออกไปได้โดยที่แอคติวิตีของคอร์เอ็นไซม์ (core enzyme) ส่วนที่เหลือ $\alpha_2\beta\beta'$ ยังคงเดิม ซิกมาแฟคเตอร์ทำหน้าที่ชี้ตำแหน่งจุดเริ่มต้นกระบวนการทรานสคริปชันซึ่งเป็นการควบคุมมากกว่าที่จะเป็นการเร่งปฏิกิริยา หน่วยย่อย β' จะจับกับ DNA สายที่เป็นแม่พิมพ์ หน่วยย่อย β จะจับกับซับสเตรทไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต นอกจากนั้นยังมีโปรตีนโอเมกา (ω, omega) โปรตีนแคปปา (k, kappa) และโปรตีนโรห์ (ϱ, rho) ที่จะคอยช่วยเหลือเอ็นไซม์ RNA polymerase ในขั้นตอนทรานสคริปชัน

เอ็นไซม์ RNA Polymerase ของ E.Coli ต้องการสิ่งต่อไปนี้

1. แม่พิมพ์ซึ่งอาจเป็น DNA สายคู่หรือสายเดี่ยวก็ได้ แต่ไม่ใช่ RNA สายคู่ RNA สายเดี่ยว RNA-DNA สายผสม

2. ไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต

3. โลหะประเภทไดวาเลนท์ คือ Mg^{+2} หรือ Mn^{+2}

13.2 การสังเคราะห์ RNA

การสังเคราะห์ RNA เหมือนกับการสังเคราะห์ DNA ในแง่ต่อไปนี้คือ

1. ทิศทางการสังเคราะห์เป็นไปในทาง 5′ → 3′ เช่นกัน

2. ขั้นตอนการเพิ่มความยาวสาย RNA เหมือนใน DNA เป็นปฏิกิริยา nucleophilic attack ของหมู่ 3′-OH ตรงปลายสายที่กำลังสังเคราะห์ไปยังอัลฟาฟอสฟอรัสอะตอมของซับสเตรทไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต

3. ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ไพโรฟอสเฟต (PP_i) จะช่วยผลักดันให้ปฏิกิริยาต่าง ๆ เกิดได้ดีขึ้น

สิ่งที่แตกต่างระหว่างการสังเคราะห์ RNA และการสังเคราะห์ DNA คือ

1. การสังเคราะห์ RNA ไม่ต้องการไพรเมอร์

2. สาย DNA ที่เป็นแม่พิมพ์สำหรับการสังเคราะห์ RNA นั้นจะถูกอนุรักษ์เต็มที่ (fully conserved) แต่ถ้าเป็นการสังเคราะห์ DNA จะเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconserved)

3. เอ็นไซม์ RNA polymerase ไม่มีแอคติวิตีของ nuclease

การสังเคราะห์ RNA แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน (รูปที่ 13-4 และ 13-5) คือ

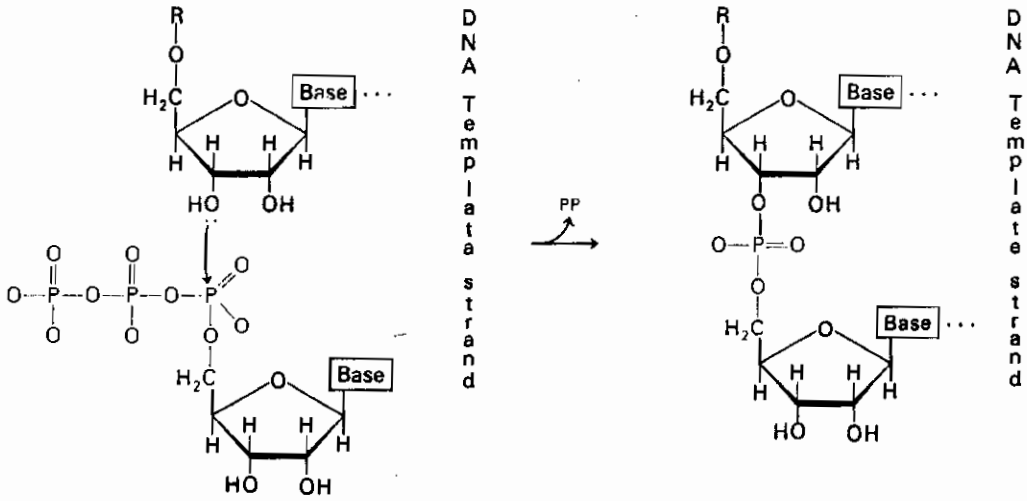
1. ขั้นตอนเริ่มต้น (Initiation)
2. ขั้นตอนเพิ่มความยาวสาย RNA (Elongation)
3. ขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์ (Termination)

I. ขั้นตอนเริ่มต้น (Initiation)

เอ็นไซม์ RNA polymerase ว่องไวต่อแม่พิมพ์ที่เป็น DNA สายคู่มากกว่าสายเดี่ยว ถึงแม้ว่าจะใช้ DNA สายคู่เป็นแม่พิมพ์ จะมี DNA เพียงสายเดียวเท่านั้นที่ถูกถอดรหัส (transcribed) ไปเป็น RNA แต่การที่จะเลือก DNA สายใดสายหนึ่งในสองสายนั้นเป็นกลไกที่ยังไม่มีผู้ใดทราบ การสังเคราะห์ RNA จึงเป็นแบบไม่สมมาตร

ซิกมาแฟคเตอร์ในโฮโลเอ็นไซม์ RNA polymerase จดจำ (recognize) การเรียงตัวของเบสตรงตำแหน่งยืนส่งเสริม (promoter gene) บน DNA แม่พิมพ์ได้ ส่วนใหญ่จะเป็นเบสพิริมิดีน ซิกมาแฟคเตอร์จึงกระตุ้นคอร์เอ็นไซม์ ($\alpha_2\beta\beta'$) ให้ไปจับตรงยืนส่งเสริม DNA แม่พิมพ์จะคลายเกลียวออก โฮโลเอ็นไซม์ RNA polymerase เกิดการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชัน ไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตตัวแรกซึ่งจะเป็นพวกเพียวรีนเสมอ คือ ATP หรือไม่ก็ GTP จะไปจับที่หน่วยย่อย β ของคอร์เอ็นไซม์ เมื่อไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตตัวที่สองซึ่งมักจะเป็นพวก

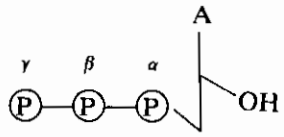
พิริมิดีน คือ UTP หรือ CTP เข้ามาจับเอ็นไซม์ จะเกิดปฏิกิริยา nucleophilic attack (รูปที่ 13-2) ของหมู่ 3′-OH ของเพียวรีนไรโบนิวคลีโอไซด์ตัวแรก ไปยังอัลฟาฟอสฟอรัสอะตอมของพิริมิดีนไรโบนิวคลีโอไซด์ตัวที่สอง สร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ขึ้นมา หมู่ไพโรฟอสเฟตหลุดไป เพียวรีนไรโบนิวคลีโอไซด์ตัวแรกยังคงหมู่ไตรฟอสเฟตตรงตำแหน่ง 5′ ตลอดระยะเวลาการสังเคราะห์ จึงเรียกปลายนี้ว่าปลาย 5′ ของโมเลกุล RNA ซึ่งจะเป็น pppA หรือ pppG เสมอ


R
O
H_2C
O
Base
H
H
H
H
HO
OH
O
O
O

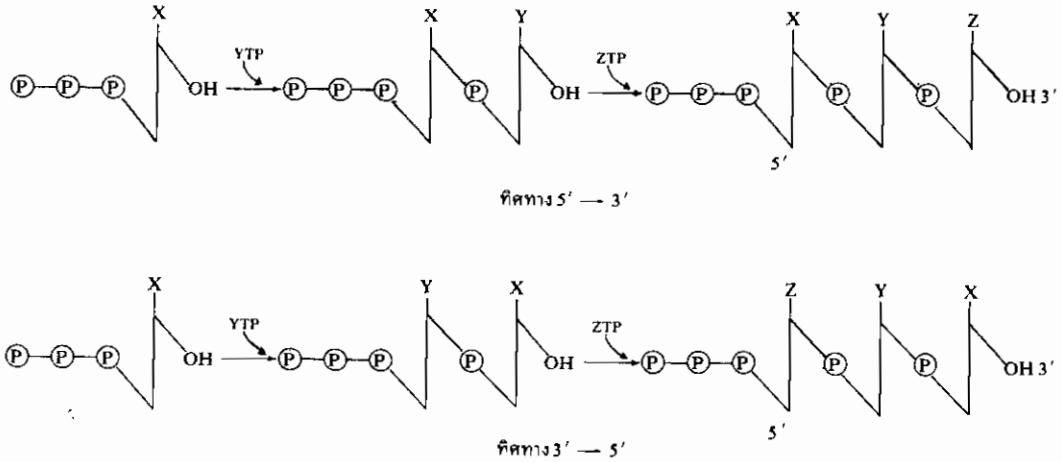
II. **ขั้นตอนเพิ่มความยาวสาย** RNA (Elongation)

การต่อสาย RNA ให้ยาวขึ้นจะดำเนินไปในทิศทาง 5′ → 3′ ซึ่งจะสวนกับทิศทาง 3′ → 5′ ของ DNA แม่พิมพ์ อัตราเร็วสูงสุดประมาณ 50 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ในขณะที่กำลังมีการสังเคราะห์ RNA นั้น RNA จะเกาะยึดอยู่กับ DNA แม่พิมพ์ชั่วขณะเป็น RNA-DNA duplex ซึ่งไม่ค่อยอยู่ตัวเหมือน DNA-DNA duplex ดังนั้น RNA จึงมีแนวโน้มที่จะหลุดออกจากสาย DNA แม่พิมพ์ได้ง่าย RNA ที่กำลังสังเคราะห์อยู่เรียกว่า nascent RNA

การที่จะรู้ว่าทิศทางการสังเคราะห์ RNA เป็นแบบ 5′ → 3′ หรือ 3′ → 5′ (รูปที่ 13-3) มีผู้ทำการทดลองโดยใช้สารกัมมันตภาพรังสี ^{32}P ติดฉลากไปบนแกมมาฟอสฟอรัสอะตอมของโมเลกุล ATP หรือ GTP



ATP ที่ติดฉลาก ^{32}P และตำแหน่งฟอสฟอรัสอะตอมบนโมเลกุล ATP



รูปที่ 13-3 ทิศทางการสังเคราะห์ RNA ทั้งสองแบบ แบบ 5′ → 3′ หมู่ไตรฟอสเฟตตรงปลาย 5′ จะมาจากนิวคลีโอไทด์ตัวแรก แบบ 3′ → 5′ หมู่ไตรฟอสเฟตตรงปลาย 5′ มาจากนิวคลีโอไทด์ตัวสุดท้าย

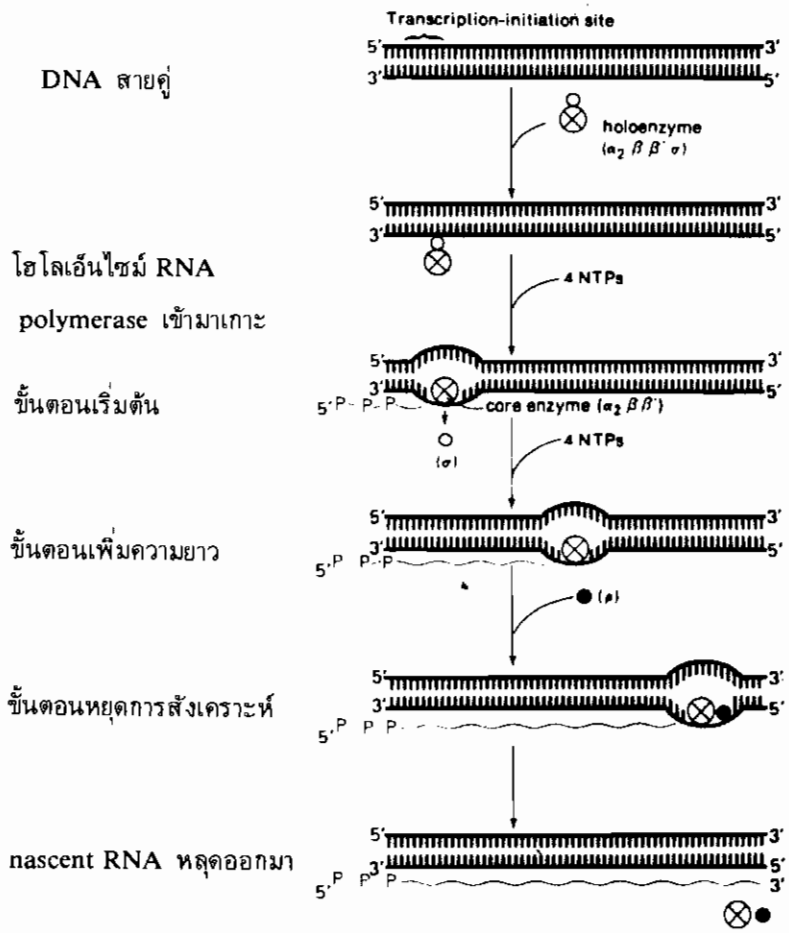
เมื่อใช้ ATP หรือ GTP ที่ติดฉลากด้วย ^{32}P เป็นซับสเตรทในการสังเคราะห์ RNA ปรากฏว่า $\frac{^{32}P}{\text{นิวคลีโอไทด์}}$ ที่ใช้ไปนั้นสูงสุดอยู่ชั่วขณะในตอนแรกแล้วค่อย ๆ ลดลง นอกจากนั้นกัมมันตภาพรังสีที่ติดฉลากไปบนสาย RNA แล้วนั้นจะไม่ลดลงเลย ถึงแม้ว่าจะเติม ATP หรือ GTP ที่ไม่ติดฉลากลงไปเป็นจำนวนมากใน incubation mixture เช่นนี้แสดงว่า ^{32}P เข้าไปอยู่ในสาย RNA ตั้งแต่แรกเริ่มของการสังเคราะห์มิใช่ว่า ^{32}P เข้าไปในขั้นตอนสุดท้าย จึงสรุปได้ว่าการสังเคราะห์ RNA เป็นไปในทิศทาง $5' \longrightarrow 3'$ เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ DNA

III. **ขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์** (Termination)

การสังเคราะห์ RNA ดำเนินไปเรื่อยจนกระทั่งคอร์เอ็นไซม์ RNA polymerase ไปพบรหัสหยุดจึงหยุดการสังเคราะห์ ตรงตำแหน่งนี้เอง nascent RNA จะหลุดออกจากแม่พิมพ์ DNA ซึ่งอาจจะต้องอาศัยความช่วยเหลือจากโปรตีนโรห์ (ρ)

โปรตีนโรห์ (ρ) เป็นเตทตระเมอร์ (tetramer) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 คาดกันว่าโปรตีนโรห์อาจไปจับที่โมเลกุล RNA แล้วเคลื่อนตัวไปหาคอร์เอ็นไซม์จากปลาย 3′ ของ RNA เป็นผลทำให้ nascent RNA หลุดเป็นอิสระออกมา ที่น่าสนใจก็คือการทำงานของโปรตีนโรห์ต้องการพลังงานจากการไฮโดรไลซ์ ATP

โปรตีนแคปปา (k) ก็มีส่วนช่วยในขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์แต่ยังไม่ทราบรายละเอียดนัก



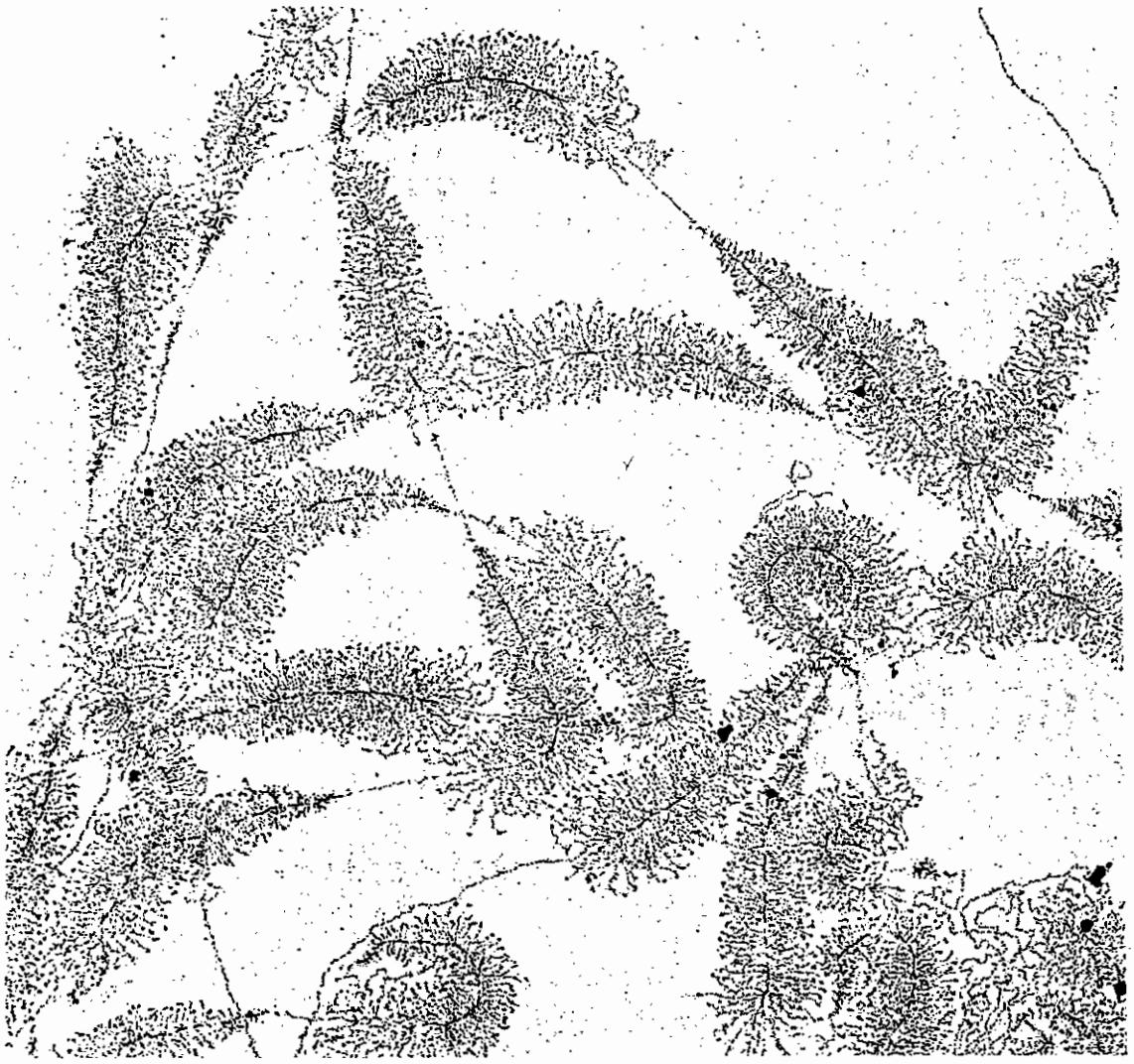
รูปที่ 13-4 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ RNA ทั้ง 3 ขั้นตอน

⊗ คือคอร์เอ็นไซม์ RNA polymerase, O คือซิกมาแฟคเตอร์

● คือโปรตีน ρ, NTPS คือนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต

การสังเคราะห์ RNA มีโอกาสที่จะผิดพลาดประมาณ $1/10^4$ หรือ $1/10^5$ อัตราการผิดพลาดนี้สูงกว่าการสังเคราะห์ DNA ถึง 10^5 เท่า RNAที่สังเคราะห์ได้จะมีการเรียงตัวของเบสที่เข้าคู่กันกับเบสบน DNA สายที่เป็นแม่พิมพ์

5'-GCGGCGACGCGCAGUUAAUCCCACAGCCGCCAGUUCCGCUGGCGGCAUUUU-3' **mRNA**
3'-CGCCGCTGCGCGTCAATTAGGGTGTCGGCGGTCAAGGCGACCGCCGTAAAA-5
5'-GCGGCGACGCGCAGTTAATCCCACAGCCGCCAGTTCCGCTGGCGGCATTTT-3' **DNA**



รูปที่ 13-5 ภาพอิเลคตรอนไมโครกราฟของการสังเคราะห์ rRNA จากแม่พิมพ์ DNA เอ็นไซม์ RNA polymerase เคลื่อนไปตามสาย DNA การสังเคราะห์มิได้เกิดตลอดสาย DNA จะมีช่วงว่างที่เรียกว่า spacer DNA

13.3 การดัดแปลงโมเลกุล RNA หลังขั้นตอนการทรานสคริปชัน (Posttranscriptional modification of RNA)

nascent RNA จะมีการดัดแปลงโมเลกุลก่อนที่จะไปทำหน้าที่ที่เฉพาะตัวต่อไป การดัดแปลงดังกล่าวพอจะแยกได้เป็น 3 วิธีการคือ

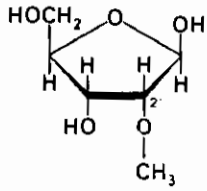
1. การตัด (cleavage) บางส่วนของ nascent RNA โดยเอ็นไซม์ที่จำเพาะ พบในโปรคาริโอท เช่น nascent RNA ที่สังเคราะห์ได้ใน E.Coli จะถูกเอ็นไซม์ nuclease ตัดแบ่งเป็นโมเลกุลของ 5S, 16S และ 23S rRNA และโมเลกุลของ tRNA (รูปที่ 13-6)

รูปที่ 13-6 nascent RNA ใน E.Coli ที่ถูกตัดออกเป็น 5S, 16S, 23S rRNA และโมเลกุลของ tRNA มีบางส่วนเหลือเป็นที่ว่างด้วย

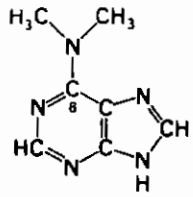
nascent mRNA ของโปรคาริโอทมีการดัดแปลงโมเลกุลน้อยมากจนแทบไม่มีเลย เพราะ mRNA ส่วนใหญ่จะถูกแปลรหัส (translated) ไปเป็นโปรตีนทั้ง ๆ ที่ขณะนั้นการสังเคราะห์ mRNA ยังไม่เสร็จสิ้น

2. การเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลายสายของ RNA บางสาย เช่น tRNA ใดที่ปลาย 3′ ยังไม่มีนิวคลีโอไทด์ CCA ก็จะมีต่อการต่อเติม CCA เข้าไป ในยูคาริโอทมีการเติม poly A เข้าที่ปลาย 3′ และ methylated guanine เข้าที่ปลาย 5′ ของโมเลกุล mRNA

3. การเปลี่ยนแปลงเบสและน้ำตาลไรโบส ในยูคาริโอทตำแหน่ง 2-OH ของน้ำตาลไรโบสของ rRNA จะเกิดปฏิกิริยาเมธิลเลชันโดยเอ็นไซม์ มี s-adenosylmethionine (SAM) เป็นตัวให้หมู่ $-CH_3$ ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นกับน้ำตาลหนึ่งหน่วยในน้ำตาลทุก ๆ ร้อยหน่วย ในแบคทีเรียเบสใน rRNA เป็นส่วนที่จะเกิดเมธิลเลชันไม่ใช่ส่วนของน้ำตาล ตัวอย่างเช่น 2′-0-เมธิลไรโบส และ 6-ไดเมธิลอะดีนีน



2'-O-Methylribose



6-Dimethyladenine

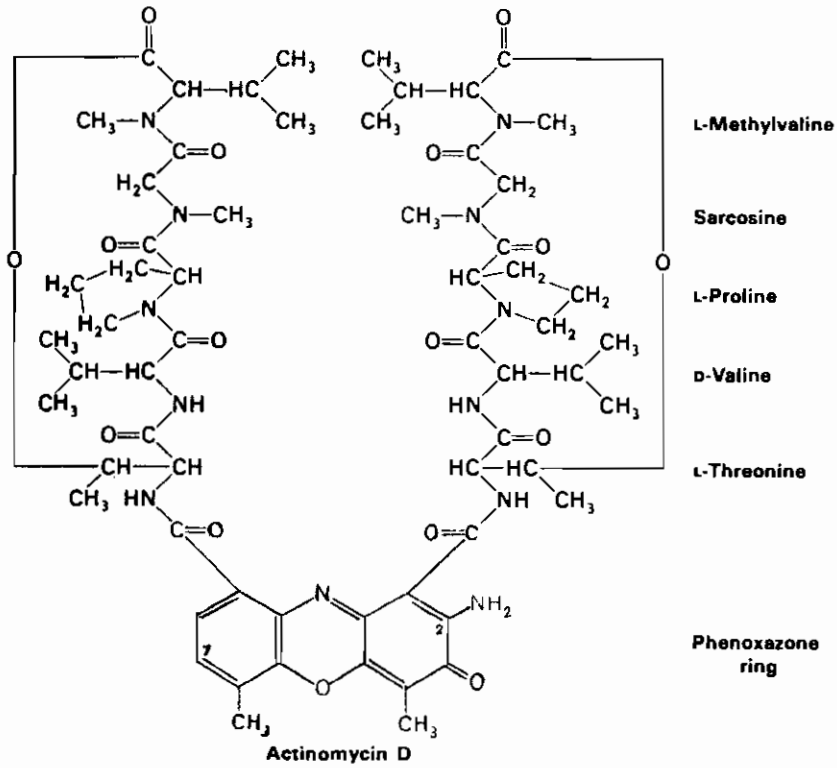
เบสแปลก ๆ ที่พบในโมเลกุลของ tRNA เช่น ribothymidine และ pseudouridine (ดูรูป 13-1) เหล่านี้ล้วนเกิดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์หลังขั้นตอนทรานสคริปชันทั้งสิ้น

การดัดแปลงโมเลกุล tRNA และ rRNA ระหว่างโปรคาริโอทและยูคาริโอทคล้ายคลึงกัน แต่การดัดแปลงโมเลกุล mRNA แตกต่างกัน mRNAของโปรคาริโอทไม่ค่อยมีการดัดแปลงเพราะถูกนำไปเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โปรตีนเลย ส่วน mRNA ของยูคาริโอทจะถูกดัดแปลงตั้งแต่ยังอยู่ในนิวเคลียส แล้วค่อยผ่านออกสู่ไซโตปลาสซึมเพื่อเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โปรตีนที่ไรโบโซม ดูเสมือนว่าการดัดแปลงโมเลกุลในลักษณะต่าง ๆ จะช่วยควบคุมการส่งผ่าน RNA จากนิวเคลียสเข้าสู่ไซโตปลาสซึม

13.4 ตัวยับยั้งการสังเคราะห์ RNA

ยาบางชนิดโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ จะมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งอย่างจำเพาะต่อกระบวนการต่าง ๆ ทางชีววิทยา ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ได้แก่ แอคติโนมัยซินดี (actinomycin D) และไรฟามัยซิน (rifamycin) นอกจากนั้นยังมีสารพิษอัฟลาทอกซิน (aflatoxin) และสารพิษอัลฟาอะมานิทิน (α-amanitin)

1. **แอคติโนมัยซินดี** เป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ที่สำคัญที่สุด ยาปฏิชีวนะนี้สกัดได้จากเชื้อ Streptomyces สูตรโครงสร้างมีลักษณะเป็นระนาบของวง phenoxazone ยึดติดกับเปปไทด์วงปิด (cyclic peptide) สองข้าง (รูปที่ 13-7) เปปไทด์วงปิดดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโนเมธิลวาลีน, ซาร์โคซีน, โพรลีน, วาลีนและธริโอนีนเรียงกันตามลำดับ เปปไทด์นี้เป็นวงปิดเพราะว่ามีการเชื่อมหมู่คาร์บอกซิลของเมธิลวาลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวแรก เข้ากับหมู่ไฮดรอกซิลของธริโอนีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวที่ห้า สร้างเป็นพันธะเอสเทอร์ขึ้นมา

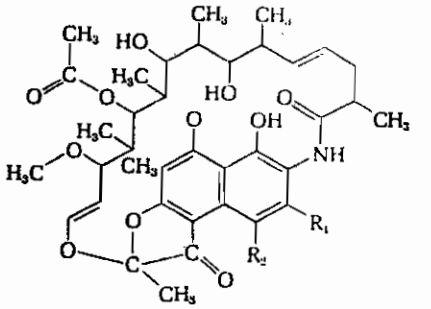


รูปที่ 13-7 โครงสร้างแอคติโนมัยซินดี มีกรดอะมิโนซาร์โคซีน, L-เมธิลวาลีน และ D-วาลีน เป็นองค์ประกอบในเปปไทด์วงปิด กรดอะมิโน 3 ตัวนี้ไม่ค่อยจะพบบ่อยนัก

ยาปฏิชีวนะแอคติโนมัยซินดียับยั้งการสังเคราะห์ RNA จากแม่พิมพ์ DNA สายคู่ได้ แต่จะไม่จับกับ DNA หรือ RNA ที่เป็นสายเดี่ยวหรือ RNA สายคู่หรือ RNA-DNA สายผสม (RNA-DNA hybrid) จากการศึกษาผลึกของคอมเพล็กซ์ระหว่างแอคติโนมัยซินดี 1 โมเลกุล และดีออกซีกวาโนซีน 2 โมเลกุลพบว่า แอคติโนมัยซินดีจะสอดแทรก (intercalate) ระนาบของวง phenoxazone เข้าไประหว่างคู่เบส G-C ที่อยู่ติดกัน เปปไทด์วงปิดวงหนึ่งจะวางตัวอยู่เหนือระนาบ ส่วนเปปไทด์วงปิดอีกวงหนึ่งจะวางตัวอยู่ใต้ระนาบของวง phenoxazone เปปไทด์วงปิดทั้งสองวงนี้จะสร้างพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงกับหมู่ 2-อะมิโนของเบสกวานีน นอกจากนั้นยังมีแรงแวนเดอวาลส์ระหว่างยาปฏิชีวนะนี้และนิวคลีโอไซด์อีกเป็นจำนวนมาก ทำให้ DNA แม่พิมพ์ไม่สามารถคลายเกลียว โมเลกุลเอ็นไซม์ RNA polymerase ที่เคลื่อนตัวมาถึงบริเวณนี้ไม่สามารถเคลื่อนตัวต่อไปได้ แอคติโนมัยซินดีจึงเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ที่จำเพาะต่อขั้นตอนเพิ่มความยาวสาย RNA ทั้งในโปรคาริโอทและยูคาริโอท ไม่ขัดขวางกระบวนการเมตา-

บอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์ ถ้าใช้ยานี้ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ จะไม่มีผลต่อกระบวนการเรพลิเคชันของ DNA

2. **ไรฟามัยซิน** เป็นยาปฏิชีวนะที่สกัดได้จากเชื้อ Streptomyces ยากลุ่มนี้ตัวที่ใช้กันมากคือไรแฟมพิซิน (rifampicin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์สังเคราะห์ของไรฟามัยซิน



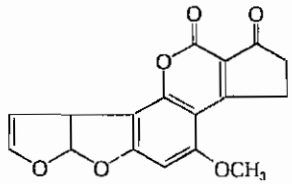
Rifamycin B (R_1 = H; R_2 = O—CH_2—COOH)

Rifampicin (R_1 = CH=N—N—CH_3; R_2 = OH)

โครงสร้างไรฟามัยซินบีและไรแฟมพิซิน

ไรแฟมพิซินจะจับกับหน่วยย่อย β ของเอ็นไซม์ RNA polymerase แบบนอน-โควาเลนท์ ขัดขวางการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์พันธะแรกในสาย RNA ทำให้สามารถยับยั้งการเริ่มต้นการสังเคราะห์ RNA ได้ ไรแฟมพิซินไม่มีผลต่อ RNA ที่กำลังเพิ่มความยาว ยานี้ใช้ได้ผลดีมากสำหรับเอ็นไซม์ RNA polymerase ของแบคทีเรียและโปรคาริโอท

3. **อัฟลาทอกซิน** เป็นสารพิษจากเชื้อรา Aspergillus flavus (A. flavus) ราชนิดนี้พบมากในแถบที่มีอากาศร้อนชื้น เช่น ประเทศในทวีปเอเชียหรืออัฟริกา เจริญเติบโตได้ดีบนธัญญพืชประเภทข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง อาหารแห้ง เช่นกุ้งแห้ง ปลาแห้งที่เก็บไว้นาน ๆ โดยเฉพาะบริเวณที่มีความชื้นระหว่าง 80-85% ชื่อสารพิษอัฟลาทอกซินมีต้นกำเนิดของชื่อมาจากชนิดของเชื้อรา

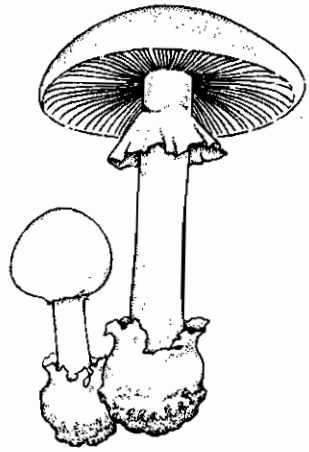


Aflatoxin B1

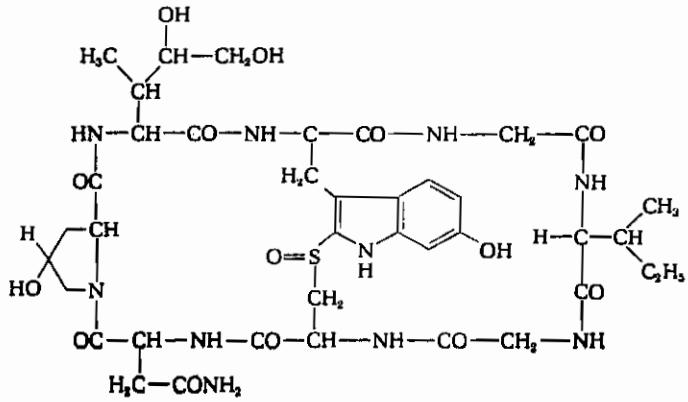
สารพิษนี้ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ทนความร้อนได้ถึง 160° C ถูกทำลายได้โดยสารละลายเจือจางของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์และสารสกัดจากกระเทียมชื่อ "allicin" สารอัฟลาทอกซินเรืองแสงได้ในช่วงแสงอุลตราไวโอเลต แบ่งเป็นอัฟลาทอกซินบีเรืองแสงสีน้ำเงิน (blue) และอัฟลาทอกซินจีเรืองแสงสีเขียว (green) ในบรรดากลุ่มสารพิษบี$_1$, บี$_2$, จี$_1$, จี$_2$, อัฟลาทอกซินบี$_1$ เป็นพิษมากที่สุด โครงสร้างของสารพิษทั้งสี่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยแต่ก็สำคัญมากต่อการแสดงความเป็นพิษ (toxicity) สารพิษกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคมะเร็งในตับและตายในที่สุด นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มยืนยันว่าสารอัฟลาทอกซินบี$_1$ เมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์ตับจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอินเตอร์มิเดียทพวกอีพอกไซด์ (epoxide) อีพอกไซด์จะไปจับกับ DNA หรือ RNA ตรงเบสกวานีนอีกทีหนึ่ง ทำให้สามารถยับยั้งกระบวนการเรพลิเคชันและทรานสคริปชันของ DNA ได้ ผลที่ตามมาคือการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ตับหยุดชะงักไปด้วย

4. **อัลฟาอะมานิทิน** เป็นสารพิษจากเห็ด amanita phalloides โครงสร้างเป็นเปปไทด์วงปิดที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนแปดตัว (รูปที่ 13-8)

สารพิษอัลฟาอะมานิทินจะจับกับเอ็นไซม์ RNA polymerase II และ III ของพวกยูคาริโอท มีผลยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มความยาวในกระบวนการสังเคราะห์ RNA ไม่มีผลต่อ RNA polymerase I แต่อย่างใด



รูปที่ 13-8 เห็ด amanita phalloides และโครงสร้าง α-อะมานิทิน



α-Amanitin

13.5 รีเวอร์สทรานสคริปชัน (Reverse transcription)

Retro-viruses เป็นไวรัสที่มักจะทำให้เกิดเนื้องอกในพวกสัตว์ต่าง ๆ เป็นRNA ไวรัสที่มีเอ็นไซม์ reverse transcriptase (เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเอ็นไซม์ RNA-dependent DNA polymerase) ทำให้สามารถสังเคราะห์ DNA จากแม่พิมพ์ RNA ได้ เอ็นไซม์พึ่งถูกค้นพบโดย Temin, Mitzuani และ Baltimore เมื่อปี 1970 RNAไวรัสเหล่านี้ทำให้เนื้อเยื่อของเซลล์ปรกติเปลี่ยนไปเป็นเนื้องอกได้โดยที่ไวรัสจะใช้เอ็นไซม์ reverse transcriptase สร้าง DNA โดยใช้

แม่พิมพ์ RNA ของตัวเองขึ้นก่อน เมื่อไวรัสนี้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) DNA ของไวรัสจะสามารถเข้าไปอยู่ใน DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน อาจมีผลเปลี่ยนแปลงเซลล์เจ้าบ้านเป็นเซลล์เนื้อร้ายได้ ซึ่งถ้าเป็นจริงเช่นนี้ในอนาคตอาจจะมีวิถีทางรักษาเนื้อร้ายหรือมะเร็งได้โดยใช้สารหรือยาที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอ็นไซม์ reverse transcriptase ใน RNA ไวรัส

บทสรุป

RNA ภายในเซลล์มี 3 ชนิดคือ rRNA tRNA และ mRNA tRNA เป็น RNA ที่โมเลกุลเล็กที่สุด ทำหน้าที่เป็นตัวพาที่จำเพาะของกรดอะมิโนต่าง ๆ mRNA มีอยู่ในปริมาณน้อยที่สุด ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โปรตีน

โปรคาริโอทมีเอ็นไซม์ RNA polymerase เพียงชนิดเดียว แต่ในยูคาริโอทมีเอ็นไซม์ RNA polymerase ถึง 4 ชนิด แต่ละชนิดแตกต่างกันตรงตำแหน่งที่อยู่ ความไวต่อสารพิษอัลฟาอะมานิทินและประเภทของ RNA ที่สังเคราะห์ โฮโลเอ็นไซม์ RNA polymerase ของ E.Coli ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 ชนิด จำนวน 5 หน่วยย่อย คือ $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ซิกมาแฟคเตอร์ (σ) แตกตัวได้และทำหน้าที่ชี้จุดเริ่มต้นการทรานสคริปชัน คอร์เอ็นไซม์ ($\alpha_2\beta\beta'$) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ RNA เอ็นไซม์ RNA polymerase ไม่มีแอคติวิตีของ nuclease

การสังเคราะห์ RNA หรือกระบวนการทรานสคริปชันเป็นไปในทิศทาง $5' \longrightarrow 3'$ เหมือนการสังเคราะห์ DNA แต่ทว่าไม่ต้องการไพรเมอร์ เอ็นไซม์ RNA polymerase เคลื่อนจากปลาย $3' \longrightarrow 5'$ ของแม่พิมพ์ DNA การสังเคราะห์ RNA แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนเริ่มต้น ขั้นตอนเพิ่มความยาวและขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์ ขั้นตอนเริ่มต้น ซิกมาแฟคเตอร์ (σ) จะเป็นตัวชี้ตำแหน่งเริ่มต้นบนสาย DNA ซึ่งมักจะเป็นเบสพิริมิดีน ทำให้เบสเริ่มต้นของ RNA เป็นเบสเพียวรีนเสมอ อาจเป็น pppG หรือ pppA ปฏิกิริยาระหว่างไรโบนิวคลีโอไทด์ตัวแรกและตัวที่สองเป็นปฏิกิริยา nucleophilic attack เมื่อเริ่มสังเคราะห์ไปได้ประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ ซิกมาแฟคเตอร์จะหลุดไปรวมกับคอร์เอ็นไซม์โมเลกุลใหม่ได้ ขั้นตอนที่สองเป็นการต่อสาย RNA ให้ยาวขึ้น RNA ที่กำลังสังเคราะห์อยู่เรียก nascent RNA ขั้นตอนสุดท้ายเมื่อคอร์เอ็นไซม์ไปพบสัญญาณจึงหยุดการสังเคราะห์ โปรตีนโรห์ (ρ) อาจมีส่วนช่วยทำให้ RNA หลุดจาก DNA แม่พิมพ์

Nascent RNA ที่ได้จะมีการดัดแปลงโมเลกุลไปในลักษณะต่าง ๆ กัน โมเลกุลบางส่วนอาจจะถูกตัดโดยเอ็นไซม์จำเพาะ หรือการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลายสาย RNA หรือการเติมหมู่เมธิลให้แก่น้ำตาลหรือเบสบางตัว เป็นต้น การดัดแปลงโมเลกุล tRNA และ rRNA ในโปรคาริโอทและยูคาริโอทคล้ายกัน แต่การดัดแปลงโมเลกุล mRNA นั้นแตกต่างกัน

แอคติโนมัยซินดีเป็นยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ทั้งในโปรคาริโอทและยูคาริโอท ตรงขั้นตอนเพิ่มความยาวโดยสอดแทรกตัวเองไปในระหว่างคู่เบส GC ที่อยู่ติดกัน DNA คลายเกลียวไม่ออกเอ็นไซม์ RNA polymerase จึงทำงานไม่ได้ ไรแฟมพิซินยับยั้งขั้นตอนเริ่มต้นโดยขัดขวางการสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์พันธะแรก ด้วยการจับหน่วยย่อย β ของ

เอ็นไซม์ RNA polymerase แบบนอน-โควาเลนท์ ส่วนสารพิษอัฟลาทอกซินนั้นถูกเปลี่ยนเป็นอีพอกไซด์ (epoxide) อีพอกไซด์จะไปจับเบสกวานีนของ DNA อีกต่อหนึ่ง ซึ่งมีผลยับยั้งทั้งเรพลิเคชันและทรานสคริปชัน สารพิษอัลฟาอะมานิทินสามารถจับเอ็นไซม์ RNA polymerase II และ RNA polymerase III ของยูคาริโอท มีผลที่ขั้นตอนเพิ่มความยาวสาย RNA

RNA ไวรัสมีเอ็นไซม์ reverse transcriptase ที่สามารถสังเคราะห์ DNA จากแม่พิมพ์ RNA ได้

คำถามท้ายบท

1. RNA แบ่งออกเป็นกี่ชนิด อะไรบ้าง แต่ละชนิดมีหน้าที่อย่างไร
2. เอ็นไซม์ RNA polymerase ในโปรคาริโอทแตกต่างกับเอ็นไซม์ RNA polymerase ในยูคาริโอทหรือไม่อย่างไร
3. บอกองค์ประกอบของเอ็นไซม์ RNA polymerase ของ E.Coli
4. การทำงานของเอ็นไซม์ RNA polymerase ต้องการสิ่งใดบ้าง
5. การสังเคราะห์ RNA มีสิ่งที่คล้ายคลึงการสังเคราะห์ DNA หรือไม่
6. การสังเคราะห์ RNA ต่างไปจากการสังเคราะห์ DNA อย่างใด
7. อธิบายขั้นตอนเริ่มต้นของกระบวนการทรานสคริปชัน
8. ท่านทราบได้อย่างไรว่ากระบวนการทรานสคริปชันนั้นเป็นไปในทิศทาง $5' \longrightarrow 3'$ หรือ $3' \longrightarrow 5'$
9. ขั้นตอนหยุดการสังเคราะห์ของกระบวนการทรานสคริปชัน ต้องอาศัยอะไรบ้าง
10. เขียนแผนภาพแสดงขั้นตอนของกระบวนการทรานสคริปชันหรือการสังเคราะห์ RNA
11. การดัดแปลงโมเลกุล RNA เกิดขึ้นขั้นตอนใด และกระทำได้ในลักษณะใดบ้าง
12. การดัดแปลงโมเลกุล RNA ที่สังเคราะห์ได้ในโปรคาริโอท เหมือนในยูคาริโอทหรือไม่อย่างไร
13. อธิบายกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โดยแอคติโนมัยซินดี
14. ไรแฟมพิซินมีผลยับยั้งขั้นตอนใดของการสังเคราะห์ RNA
15. ปัจจุบันคาดกันว่าสารอัฟลาทอกซินมีผลอย่างไรต่อกระบวนการเรพลิเคชันและทรานสคริปชันของ DNA
16. สารพิษจากเห็ด amanita phalloids ชื่อว่าอย่างไร สามารถยับยั้งเอ็นไซม์ RNA polymerase ของยูคาริโอทหรือโปรคาริโอท
17. รีเวอร์สทรานสคริปชันหมายถึงอะไร